

17. 動物管理室

室長 山田 靖子

概要

国内の動物施設では、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」の平成 25 年改正に基づき、自己点検評価、その公表、および外部機関による評価を推進しているところである。感染研では、動物実験施設の自己点検を平成 25 年度より 1 年 1 回行うこととし、本年度も動物実験委員会が村山庁舎、ハンセン病研究センター、戸山庁舎の動物実験施設に立ち入って調査を行った。また、戸山庁舎動物実験施設は平成 27 年 1 月 28 日にヒューマンサイエンス振興財団による 3 回目の外部評価を受け、引き続き認定された。

平成 27 年 1 月 20 日より村山庁舎施設運営連絡協議会が開始され、動物管理室は動物管理に関する説明を担当し、動物実験施設の見学に対応した。

平成 27 年 3 月 2、3 日の 2 日間、日本実験動物学会主催の実験動物管理者研修会が戸山庁舎感染研共用第 1 会議室で開催され、動物管理室の研究員が協力した。

平成 26 年 7 月に戸山庁舎の動物飼育室自動照明制御盤が作動不備となり、約 2 カ月手動で対応した。村山庁舎において、針刺し事故 1 件があった。

動物管理室の主な業務は感染研動物実験施設の管理運営と研究者が行う動物実験への支援である。平成 26 年度より、従来の業務に加えて、胚の凍結保存、胚操作による動物の清浄化などの業務を行っている。

実験動物に関する研究を昨年度に引き続き行なった。実験動物の感染症に関する研究では、マウス肝炎ウイルスの病原性に関する研究、Tyzzler 菌の鞭毛蛋白に関する研究、モデル動物の開発研究として、カンクイザルの麻疹ウイルス病態モデル、イヌジステンパーウイルス感受性マウスの開発、インターフェロン欠損コウモリ細胞株の樹立、人獣共通感染症の研究として、ヒトバベシア症の研究を行った。

動物管理室は海外および国内から動物実験施設見学や動物実験施設管理運営の研修を受け入れている。平成 26 年度は獣医師育成プログラム、東京大学獣医学科学生

実習、JICA「ワクチン品質管理技術コース」研修、JICA 国別研修（ベトナム）、に対応した。

動物管理室長は所内の業務に加えて、日本実験動物学会常務理事、国内の動物実験施設認証制度の委員、所外機関の実験動物感染症に関する委員会委員、GLP 評価委員会委員、実験動物管理者研修講師、など、国内の実験動物学に寄与する活動を行った。また、感染研は厚生労働省関係研究機関動物実験施設協議会に加盟し、国内情勢の情報共有に参画している。

講習会開催及び動物管理区の利用状況

動物管理室は動物実験委員会の事務局を担当し、動物実験講習会を開催している。講習会では、実験動物及び動物実験に関する法規制、機関内規程、また動物実験の 3Rs を実践するための基本的な事項を受講者に解説する。講習会の会場では実技の研修を実施できないため、新規に動物実験を行う従事者に対して、国内の団体が作成した動物取扱および投与方法のビデオで実技の基本を学ぶ機会を提供している。平成 25 年 1 月 10 日機関内規程及び動物実験委員会の見解を改正した後、動物実験講習会の受講者数は、平成 27 年 3 月 31 日までに 549 名であった。平成 26 年度に申請された動物実験計画は 373 件であった。

動物実験委員会の講習会とは別途に、各庁舎ではそれぞれの動物実験施設の利用方法および実験動物の飼養・保管に関する講習会を行い、受講者を施設利用者として登録している。各施設の利用登録者数は平成 27 年 3 月 31 日現在、戸山庁舎 219 人、村山庁舎 249 人、ハンセン病研究センター 27 人である。感染研の 3 庁舎で飼養保管している動物の合計は平成 27 年 3 月 31 日現在、マウス (6,263 匹)、ラット (193 匹)、モルモット (369 匹)、ウサギ (39 羽)、スナネズミ (16 匹)、ハムスター (12 匹)、フェレット (38 匹)、ネコ (9 匹)、霊長類 (88 匹)、ニワトリ (10 羽) である。

施設利用及び動物実験講習会 受講実績

開催 月日	開催 場所	受講者数			
		施設利用 (戸山)	施設利用 (村山)	施設利用 (ハン セン)	動物 実験 (全所)
4月9日	戸山	24			30
6月4日	戸山	3			9
6月10日	戸山	2			4
7月4日	ハンセン			1	
7月9日	ハンセン			1	
10月8日	戸山	10			15
11月28日	戸山	2			3
1月26日	戸山	1			
2月4日	戸山	6			7
3月1日	村山		11		
3月13日	戸山	1			1
合計		49 新規	11 新規	2 新規	69 新規

(斜字は外国人対象講習会)

業績

調査・研究

I. 動物実験施設の管理

1. 微生物モニタリング定期検査

戸山、村山両庁舎の各飼育室にモニター動物を配置し、月一回定期的に微生物モニタリングを行っている。また、5月からはハンセン病研究センターのモニター動物についても戸山庁舎で検査を行っている。モニタリング結果は別表1に示す。緑膿菌、黄色ブドウ球菌に陽性が散見されたが、これらはいわゆる日和見病原体で免疫機能が正常な動物には病原性はない。それ以外の病原体については全て陰性であり、飼育室は清浄に保たれている。

(網 康至、滝本一広、新倉 綾、田原口元子、須崎百合子、山田靖子)

2. 胚操作業務

感染研の動物実験施設で繁殖している遺伝子改変マウス等を対象として、利用者の依頼により精子・受精卵の凍結保存および胚移植によるクリーニング等の研究支援業務を行っている。平成26年度は5系統の依頼があり、精子および受精卵の凍結保存を実施した。

また、受精卵の凍結保存、融解作業が簡易な凍結保存液(5E5D)の検討を行った。5E5D保存液を用いて凍結保存し

た C57BL/6 系統のマウス受精卵について、従来用いている凍結保存溶液(DAP213)と比較して、融解後の生存率と移植で得られた産仔数に差は認められなかった。今後は、BALB/c 系統について品質の検討を行う予定である。

(田原口元子、河合康洋、山田靖子)

II. 実験動物の感染症に関する研究

1. マウス肝炎ウイルスの病原性に関する研究

マウス肝炎ウイルスの親株 MHV2 とその変異株 MHV-2f をマウスに接種し感染実験を行った結果では、病原性の著しい相違を示していた。そこで、MHV2 と MHV-2f の病原性の相違を詳細に解明するため、マウス体内での臓器別によるウイルス増殖の変化を検討した。経時的に採取した感染マウスの肝臓、脳および大腸では MHV2 の方が MHV-2f よりウイルス価 (PFU) が 10^3 から 10^5 以上も高く MHV2 接種マウス体内で顕著な増殖を示していることが分かった。さらに、肺および脾臓の検討を進めている。

(田原口元子、新倉 綾、山田靖子)

2. Tyzzer 菌 (*Clostridium piliforme*) の組換え鞭毛蛋白の発現

クロストリジウム属細菌の鞭毛蛋白の塩基配列を元に作成した縮重プライマーを用いて Tyzzer 菌 (RT 株) の鞭毛蛋白 flagellin 遺伝子の塩基配列 (813bp) を決定した。この flagellin 遺伝子を組換えバキュロウイルス DNA (Bacmid) へ挿入し、Sf9 細胞へトランスフェクションして組換えバキュロウイルスを作製した。Sf9 細胞へ感染させて鞭毛蛋白を発現させたが、分子量が約 30kD であり想定した分子量 (53-56kD) より小さく、発現量も少なかった。また、Tyzzer 菌から分離した鞭毛蛋白の N 末端アミノ酸配列が、今回決定した塩基配列と異なっていたため、この配列も考慮に入れて Tyzzer 菌鞭毛蛋白の塩基配列について再検討する。

(滝本一広)

III モデル動物の開発

1. ムンプスウイルス感染モデル動物の開発と病態解析
コモンマウスセットを用いたムンプスウイルス感染モデルについて、その評価および病態解析を行っている。ウイルス株により、接種後感染早期の異なった時期に末梢血リンパ球数の増加、あるいは血漿中 LDH の顕著な上昇が認められた。この結果は、これらの血液学的動態と病原性との相関を明らかにすることにより、ワクチン株を含むウイルス株間の病原性を評価できる可能性を示唆する。[網 康至、須崎百合子、木所 稔¹ (1ウイルス第3部)]

2. イヌジステンパーウイルス(CDV)感染症モデルマウスの開発

イヌジステンパーウイルス(CDV)は、野生動物を中心として蔓延しており、マカク属サルにまで宿主域を拡大している。CDVの主要な感染経路は飛沫/接触感染であり、最初に標的になるのは気管支周囲のリンパ節や扁桃に存在する血球系細胞である。CDVは血球系細胞に発現するSLAMを介して感染、増殖し、血流を介して呼吸器・消化器・皮膚の上皮細胞へ到達し、上皮細胞に発現するNectin4を介して感染、さらには中枢神経のグリア細胞や神経細胞へも感染することが知られている。しかしながら、CDVが感染、発症するモデルマウスは存在せず、CDVの病原性を研究する上で必要不可欠となっている。そこで本研究ではCDVを感染、発症するモデルマウス作製を試みる。本年度はカニクイザルSLAM Knock-in, およびNectin4 TG マウス作製の為の相同組換えES細胞の樹立を行った。今後、これらES細胞を用いてそれぞれのマウスを作製する予定である。

[河合康洋、森川 茂¹、阪井弘治² (1 獣医科学部、²エイズ研究センター)]

3. インターフェロン関連遺伝子欠損コウモリ細胞株樹立

コウモリ類は多くのウイルスの自然宿主であり、近年、未知/既知ウイルスの探索を目的としたコウモリのサーベイランスが世界各国で行われている。しかしながら、ウイルス遺伝子や抗体が検出される検体であっても、ウイルスそのものが分離されない事例が多い。そこで本研究では、コウモリ由来細胞から抗ウイルス応答に重要なIFN産生に関わる自然免疫関連遺伝子を、遺伝子編集技術(CRISPR/Cas9 システム)を用いてノックアウトすることにより、効率的にコウモリウイルスが分離できるcell lineを樹立することを試みた。その結果、ヤエヤマオコウモリ由来細胞株からMyd88遺伝子を欠損した細胞株が樹立された。今後、IFN産生に関わる遺伝子を2重、3重に欠損した細胞株の作製を行うとともに様々なコウモリ由来ウイルスを用いて作製された細胞株の評価を行っていく予定である。

[河合康洋、加来義浩¹ (1 獣医科学部)]

IV. 人獣共通感染症に関する研究

1. ヒトバベシア症に関する研究

Babesia divergens は欧州を中心に分布し、マダニ媒介性人獣共通感染症をおこす原虫であるが、最近、米国で近縁種による死亡例が相次ぎ、新興感染症として注目されて

いる。本研究では、5つの道府県のニホンジカシカ (*Cervus nippon*) 11 検体より *B. divergens* 様の遺伝子を検出したので18S rRNA 及び β -tubulin 遺伝子による系統解析を行ったところ、日本の *B. divergens* が欧州や米国のもとの遺伝的に近縁で、同じクラスターに属する亜種であることが判明した。シカが保有する病原体にヒトが感染するリスクは高まっており、早急な診断法の開発と患者発生との監視が必要であろう。

[新倉 綾、森川 茂¹、平田晴之²、石原智明² (1 獣医科学部、²酪農学園大学)]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表
 - 1) Zamoto-Niikura, A., Tsuji, M., Imaoka, K., Kimura, M., Morikawa, S., Holman, P.J., Hirata, H., and Ishihara, C. Sika Deer Carrying *Babesia* Parasites Closely Related to *B. divergens*, Japan. *Emerg Infect Dis.* 20: 1398-1400. 2014
 - 2) Zamoto-Niikura, A., Tsuji, M., Qiang, W., Hirata, H., Nakajima, R., Morikawa, S., Holman, P.J., and Ishihara, C. Survey and Molecular Analysis of *Babesia microti* Group Parasites in Japan: Strategy and Surveying for Identification of Tick Vectors. In *Epidemiology II - Theory, Research and Practice*. iConcept Press, ed. Hong Kong. 2014 (Published online).
 - 3) Hanaki, K., Ike, F., Kajita, A., Yasuno, W., Yanagiba, M., Goto, M., Sakai, K., Ami, Y., and Kyuwa, S. Detection of murine norovirus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods.* 204C: 17-24. 2014
 - 4) Hanaki, K., Ike, F., Kajita, A., Yasuno, W., Yanagiba, M., Goto, M., Sakai, K., Ami, Y., and Kyuwa, S. A broadly reactive one-step SYBR green I real-time RT-PCR assay for rapid detection of murine norovirus. *PLoS ONE.* 9: e98108. 2014
 - 5) Taharaguchi, M., Takimoto, K., Zamoto-Niikura, A., and Yamada, Y.K. Effect of Weak Acid Hypochlorous Solution on Selected Viruses and Bacteria of Laboratory Rodents. *Exp. Anim.* 63:141-147. 2014

- 6) Nakahara, R., Kawai, Y., Oda, A., Nishimura, M., Murakami, A., Azuma, T., Kaifu, T., and Goitsuka, R. Generation of a Tlx1(CreER-Venus) knock-in mouse strain for the study of spleen development. *Genesis*. 52:916-23. 2014

II. 学 会 発 表

1. 国内学会

- 1) 花木賢一、池郁生、酒井宏治、網康至、久和茂：マウスノロウイルスを検出する遺伝子増幅法4法の実用性比較. 第61回日本実験動物学会総会. 平成26年5月. 北海道.
- 2) 根来沙弥、平田晴之、新倉綾、浅川満彦、萩原克郎、石原智明：北海道のエゾシカ (*Cervus nippon yezoensis*) における *B. divergens* の感染状況の把握と進化系統解析. 第157回日本獣医学会学術集会. 平成26年9月. 北海道.
- 3) 新倉綾、森川茂、平田晴之、石原智明：北海道のシユルツマダニ *Ixodes persulcatus* から分離された *Babesia microti* の性状解析. 第157回日本獣医学会学術集会. 平成26年9月. 北海道.